

مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی از عصاره‌های گیاهی بر باکتری یرسینیا راکری در شرایط آزمایشگاهی *Yersinia ruckeri*

میلاد عادل^{۱*}، رضا صفری^۲، محمد جلیل ذریه زهرا^۱، راضیه الهی^۳

*miladadel85@yahoo.com

- ۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، تهران صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۶
- ۲- بخش زیست فناوری، پژوهشکده اکولوژی خزر، ساری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، صندوق پستی: ۹۶۱
- ۳- دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، صندوق پستی: ۱۱۵

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۴

چکیده

به دنبال افزایش روز افزون مقاومت‌های باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های تجاری رایج، گرایش به استفاده از گیاهانی با خواص ضد میکروبی افزایش یافته است. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهان گلپر (*Heracleum persicum*)، رازیانه (*Foeniculum Vulgare*)، اسفرزه (*Plantago psyllium*)، چای سبز (*Camellia Sinensis*)، گزنه (*Urtica dioica*) و سیر (*Allium sativum*) بر باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین قدرت ضد باکتریایی عصاره‌ها از روش‌های استاندارد، انتشار در دیسک، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) استفاده گردید و فورازولیدون به عنوان نمونه استاندارد به کار گرفته شد. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره‌های گلپر، رازیانه، اسفرزه، چای سبز، گزنه و سیر برای باکتری یرسینیا راکری به ترتیب ۴۰۰، ۷۵، ۲۵۰، ۲۵۰، ۷۵ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مقادیر حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های مذکور به ترتیب ۶۱۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و قطر هاله مهار رشد باکتری به ترتیب $17/6 \pm 1/2$ ، $23/6 \pm 1/2$ ، $20/4 \pm 0/9$ ، $18/8 \pm 0/7$ ، $21/2 \pm 1/3$ و $22/6 \pm 1/1$ میلی‌متر بدست آمد. در این مطالعه عصاره‌های رازیانه، گزنه و سیر اثرات ضد باکتریایی مناسبی را روی باکتری یرسینیا راکری از خود نشان دادند. بنابراین، عصاره‌های گیاهی رازیانه، گزنه و سیر پس از انجام مطالعات تکمیلی، می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌های تجاری رایج به منظور درمان عفونت‌های سیستماتیک ناشی از باکتری یرسینیا راکری باشند.

کلمات کلیدی: اثرات ضد باکتریایی، عصاره‌های گیاهی، یرسینیا راکری.

*نویسنده مسئول

مقدمه

بیماری دهان قرمز باکتریایی (Enteric Redmouth) یا یرسینیوزیس یکی از بیماری‌های باکتریایی مهم در صنعت پرورش ماهیان سردابی می‌باشد، که در چند سال اخیر باعث بروز تلفات در مزارع سردابی کشور شده است. عامل بیماری باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) می‌باشد که دارای ۶ سروتیپ است که سروتیپ ۱ و ۲ آن قدرت بیماری‌زایی بیشتری دارند. این باکتری جزو خانواده انتروباکتریاسه بوده که به شکل کوکوباسیل‌های گرم منفی، میله‌ای، فاقد اسپور، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت می‌باشد که به عنوان یک عامل بیماری‌زا برای بسیاری از گونه‌های مختلف ماهیان از جمله خانواده آزاد ماهیان می‌باشد. حساس‌ترین گونه به این بیماری قزل‌آلای رنگین‌کمان به ویژه در اندازه انگشت قد می‌باشد. مهم‌ترین علائم بالینی مشاهده شده در این بیماری شامل: خونریزی در داخل دهان، فکین، قاعده باله‌ها و اندام‌های داخلی، بیرون زدگی چشم‌ها همراه با لکه‌های خونی در آن، تیرگی بدن، بی‌اشتهایی، نکروز در اندام‌های خونساز و روده می‌باشد (*Zorriehzahra et al., 2012*). مقاومت‌های دارویی روز افزون علیه این باکتری و افزایش دوز مصرفی داروهای متداول از یک سو و افزایش عوارض جانبی ناشی از استفاده از این داروها از سوی دیگر، موجب شده است تا در سال‌های اخیر توجه بیشتری به استفاده از گیاهان دارویی معطوف شود که دارای حداقل اثرات سوء می‌باشند (*Alishahi et al., 2010*). آثار ضد باکتریایی گیاهانی از قبیل آویشن، سیاه‌دانه، اسکوتلاریا، پوست انار، زیتون، آلوئه‌ورا و خار مریم بر باکتری یرسینیا راکری در شرایط آزمایشگاهی توسط Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) مورد بررسی قرار گرفته شده است.

گلپر *Heracleum persicum* گیاهی علفی، یک ساله، معطر و متعلق به خانواده چتریان (*Apiaceae*) می‌باشد (Mandenova, 1987). دامنه انتشار این گیاه در ایران مربوط به استان‌های شمالی و مرکزی و رویش آن در ارتفاعات ۱۵۰۰ متر و بالاتر می‌باشد (*Zargary, 1991*). از میوه این گیاه معطر به منظور تسهیل هضم غذا، به عنوان طعم‌دهنده، خوشبو کننده و به عنوان یک

ترکیب ضد نفخ و ضد عفونی کننده استفاده می‌شود (*Shahrani et al., 2006*).

گیاه رازیانه با نام علمی *Foeniculum Vulgare* از خانواده چتریان (*Apiaceae*) و از تیره‌ی جعفری است. این گیاه در مناطق وسیعی از اروپا مخصوصاً در مناطق مدیترانه‌ای کشت می‌شود (*Zargary, 1991*). در ایران در استان‌های شمالی، تبریز، کردستان، خراسان، کرمان و نواحی مختلف البرز می‌روید. ترکیبات شاخص دانه رازیانه شامل آنتول، لیمونن و فنچون است (*Miguel et al., 2010*). بررسی‌های صورت گرفته بر روی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاه رازیانه، تأیید کننده اثرات ضد باکتریایی آن، به ویژه بر علیه باکتری‌های گرم مثبت بوده است (*Sagdic et al., 2005*).

گیاه اسفرزه (*Plantago psyllium*) متعلق به خانواده *Plantaginaceae* و دارای حدود ۲۵۰ گونه است (*Zargary, 1991*). این جنس دارای پراکنش جهانی بوده و دو گونه مهم این جنس در ایران تحت عنوان اسفرزه شناخته می‌شود که دارای مصارف زیاد در صنعت و در طب سنتی است (*Zargary, 1991*). از مصارف مهم این گیاه در طب سنتی می‌توان به استفاده جهت کاهش اوره خون، درمان سرفه، کاهش فشار خون و دمای بدن، رفع یبوست و درمان بیماری‌های چشمی، قرمزی، تورم و حساسیت به نور اشاره کرد (*Libster, 2002*). ترکیبات موجود در دانه اسفرزه شامل اسید بنزوئیک، اسید کافئیک، اسید فوماریک، اسید آسکوربیک، آلکالوئید و آمینواسیدها می‌باشد (*Motamedi et al., 2010*).

چای سبز با نام علمی *Camellia Sinensis* گیاهی متعلق به خانواده نعناع و یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان ایران می‌باشد (*Jean et al., 2011*). چای سبز غنی از مواد آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب، ضد سرطان، پلی‌فنل‌ها و کافئین می‌باشد (*Shoa et al., 2008*). مطالعات مختلف نشان دهنده اثرات ضد باکتریایی این گیاه بر روی باکتری‌هایی از قبیل سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی بوده است (*Silva & Fernandes, 2010; Jean et al., 2011*).

این تحقیق به منظور ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهان گلپر، رازیانه، اسفرزه، چای سبز، گزنه و سیر بر باکتری یرسینیا راکری در مقایسه با داروی شیمیایی فورازولیدون در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه صد گرم از هر گیاه پس از جمع آوری از رویشگاه های طبیعی استان مازندران و پس از تأیید توسط بخش گیاه شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد (با شماره های ثبت شده ۱۵۵۲-۱۵۴۶) (جدول ۱)، در محیط خشک و تاریک، به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک گردید و سپس آسیاب و به صورت پودر در آمد. پودر به دست آمده در بالن یک لیتری و با نسبت ۱ به ۵ با الکل اتیلیک ۸۰٪ مخلوط شد و به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه شیکر به آرامی مخلوط گردید. سپس مخلوط به دست آمده توسط صافی و قیف بوخنر صاف شد. عصاره اولیه به دست آمده وارد دستگاه تقطیر دوار گردید و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ ساعت الکل پرانی صورت گرفت و عصاره تغلیظ شده به دست آمده تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شد (Sivam, 2001).

گزنه با نام علمی *Urtica dioica* گیاهی چند ساله، علفی، با ارتفاع ۱۰-۸ سانتیمتر از خانواده *Urticaceae* می باشد که محل رویش آن نواحی شمال، شمال غرب و مرکز ایران می باشد (Zargary, 1991). در طب سنتی از این گیاه به عنوان ضد التهاب، کاهنده فشار و قند خون، مدر، ضد درد، بی حس کننده موضعی و به عنوان داروی کمکی جهت درمان دیابت و بر طرف کننده درد شکم استفاده شده است (Zargary, 1991). از جمله خواص گزنه می توان به اثرات ضد قارچی، ضد ویروسی و ضدباکتریایی آن اشاره داشت (Rakhshandehroo et al., 2009). ترکیبات این گیاه شامل فلاونوئیدها، لکتین ها، پلی ساکاریدها، اسید فرمیک، اسید استیک و اسید بوتیریک است (Zargary, 1991).

گیاه سیر *Allium sativum* از خانواده چتریان دارای ترکیبات متنوعی از انواع اسیدهای آمینه، مواد معدنی، ویتامین ها، فلاونوئیدها، ترکیبات فرار و غیرفرار با ارزش دارویی و درمانی قابل توجه است (Tabanca et al., 2007). مطالعات نشان دهنده آن است که این گیاه دارای خواص ضد میکروبی و قارچی، اثرات آنتی اکسیدانی و متعادل کننده فشار خون می باشد (Abd-Elallatif & Ebraheem, 1996; Whitmore & Naidu, 2000).

جدول ۱: معرفی گیاهان و بخش های مورد استفاده آنها

نام گیاه	نام علمی	خانواده	بخش مورد استفاده
گلپر	<i>Heracleum persicum</i>	Umbelliferae	میوه
رازیانه	<i>Foeniculum vulgare</i>	Umbelliferae	دانه
اسفرزه	<i>Plantago psyllium</i>	Plantaginaceae	بخش هوایی
سیر	<i>Allium sativum</i>	Alliaceae	میوه
چای سبز	<i>Camellia Sinensis</i>	Lamiaceae	بخش هوایی (ساقه و برگ)
گزنه	<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	بخش هوایی

گزنه و سیر از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (حاوی $10^6 \times 1/5$ باکتری) بر روی محیط ژلوز خون دار کشت داده شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از عصاره های رقیق نشده به دیسک های فیلتراسیون (قطر ۵ میلیمتر) اضافه شد و

برای انجام مطالعات خواص ضد باکتریایی عصاره ها از باکتری یرسینیا راکری با شماره دستیابی KC291153 استفاده شد (که به صورت لیوفیلیزه از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد). به منظور ارزیابی میزان فعالیت ضد میکروبی عصاره های گلپر، رازیانه، اسفرزه، چای سبز،

نتایج

نتایج این مطالعه نشان دهنده اثرات ضد باکتریایی مناسب برخی از عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه روی باکتری یرسینیا راکری است، به طوری که این اثر قابل مقایسه با آنتی بیوتیک رایج (فورازولیدون) مورد استفاده بر علیه این باکتری می‌باشد. نتایج اندازه گیری قطر هاله مهارى نشان داد که قطر هاله مهارى فورازولیدون $16/1 \pm 0/4$ میلی‌متر و برای عصاره‌های گلپر، رازیانه، اسفرزه، چای سبز، گزنه و سیر به ترتیب $17/6 \pm 0/6$ ، $17/6 \pm 1/2$ ، $23/6 \pm 0/9$ ، $20/4 \pm 0/7$ ، $18/8 \pm 0/7$ و $21/2 \pm 1/3$ میلی‌متر تعیین شد (جدول ۲). بر اساس نتایج حاصله، اندازه منطقه مهار رشد یرسینیا راکری تحت تأثیر عصاره‌های رازیانه، اسفرزه، سیر و گزنه به طور معناداری در سطح بالاتری از فورازولیدون قرار داشت ($p < 0/05$). از طرف دیگر اندازه منطقه مهار رشد این باکتری تحت تأثیر عصاره‌های گلپر و چای سبز در سطوح نزدیک به فورازولیدون بود و اختلاف معناداری بین آنها مشاهده نشد ($p > 0/05$). از سوی دیگر DMSO ۴٪ اضافه شده به دیسک‌های فیلتر (به عنوان کنترل منفی) سبب مهار رشد باکتری نشد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که محدوده MIC عصاره‌های مورد مطالعه بین ۴۰۰-۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار داشت (جدول ۲). MIC عصاره گزنه و رازیانه برای یرسینیا راکری ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای اسفرزه و چای سبز ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، برای سیر و گلپر به ترتیب ۱۵۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین مقادیر MBC برای عصاره‌های گلپر، رازیانه، اسفرزه، چای سبز، گزنه و سیر به ترتیب ۶۱۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (جدول ۲). این در حالی است که مقادیر MIC و MBC فورازولیدون برای باکتری یرسینیا راکری به ترتیب ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد.

دیسک‌ها بر روی محیط کشت باکتری قرار داده شد (Roomiani *et al.*, 2013). در این مطالعه، از دیسک فورازولیدون برای کنترل مثبت استفاده شد، همچنین به عنوان کنترل منفی، ۵ میکرولیتر DMSO ۴٪ به دیسک های فیلتر اضافه شده و سپس در دمای ۲۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. پس از گذشت این زمان قطر منطقه مهار رشد باکتری بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۳ تکرار برای هر عصاره در نظر گرفته شد). برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد هر یک از عصاره‌ها از روش ماکرودایلوشن استفاده گردید. بدین منظور ابتدا رقت متوالی از عصاره‌ها در لوله‌های ونوجکت حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت TSB (تریپتو سوی برات) و ۴ درصد DMSO قرار داده شد. از کشت ۴۸ ساعته، سوسپانسیون باکتریایی با تراکم $10^6 \times 1/5$ تهیه و به میزان ۱۰ میکرولیتر به هر یک از رقت‌ها تلقیح گردید. سپس محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرم‌خانه گذاری شد. گروه کنترل در این آزمایش شامل کنترل مثبت (محیط کشت فاقد عصاره، حاوی DMSO و باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت با رقت متوالی عصاره و فاقد باکتری) نیز لحاظ شد. پس از ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از عصاره که در آن کدورت مشاهده نشد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. از رقت‌های MIC و بیشتر از آن به میزان ۱۰ میکرولیتر روی محیط زلوز خون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و کمترین غلظتی که در آن هیچ پرگنه باکتری رشد نکرد به عنوان MBC لحاظ شد (Soltani *et al.*, 2013). مقایسه آماری داده‌ها بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید ($p < 0/05$).

جدول ۲: مقایسه قدرت ضد باکتریایی عصاره های گیاهی مورد مطالعه بر باکتری یرسینیا راگری در مقایسه با فورازولیدون

عصاره	میزان MIC (µg/ml)	میزان MBC (µg/ml)	میانگین منطقه مهار رشد (میلی متر)	
			کنترل منفی (DMSO/۴٪)	کنترل مثبت (فورازولیدون)
تیمارها				
گلپر	۴۰۰	۶۱۰	-	۱۶/۱±۰/۶ ^a
رازیانه	۷۵	۱۰۰	-	۱۶/۲±۰/۳ ^a
اسفرزه	۲۵۰	۵۰۰	-	۱۶/۱±۰/۲ ^a
سیر	۱۵۰	۲۵۰	-	۱۶/۳±۰/۴ ^a
چای سبز	۲۵۰	۲۵۰	-	۱۶/۱±۰/۲ ^a
گزنه	۷۵	۱۵۰	-	۱۵/۹±۰/۴ ^a

اعدادی که در هر ردیف با حروف متفاوت مشخص شده اند، نشان دهنده اختلاف معناداری در سطح ۰/۰۵ می باشد (P < ۰/۰۵).

بحث

به دلیل تاثیر گذاری بهتر و عوارض جانبی کمتر در صنعت آبی پروری افزایش داده است (Soltani et al., 2013). خاصیت ضد میکروبی گیاهان عموماً به دلیل وجود ترکیبات فنولی، ساپونین، تانن و فلاونوئیدهای موجود در ساختارهای آنها می باشد که با تاثیر بر روی غشای پلاسمایی و سلولی میکروارگانیسم ها و یا با مهار آنزیم های ساختاری غشای سلولی آنها خاصیت ضد میکروبی خود را اعمال می نمایند (Soltani et al., 2013). تاکنون مطالعات اندکی در مورد خواص ضد باکتریایی گیاهان دارویی روی باکتری یرسینیا راگری صورت گرفته است. مطالعه Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) نشان دهنده اثرات ضد باکتریایی مناسب عصاره پوست انار، سیاه دانه و آویشن شیرازی بر روی این باکتری بود، به طوری که قطر هاله مهار رشد باکتری برای این سه گیاه به ترتیب ۲۲، ۲۰ و ۱۶ میلی متر به دست آمد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که در بین عصاره های گیاهی مورد مطالعه، عصاره رازیانه بیشترین اثر مهار کنندگی باکتری یرسینیا راگری را با قطر هاله بازدارندگی ۱/۲±۲۳/۶ میلی متر داشته است. نتایج بررسی Soyulu و همکاران (۲۰۰۹) نیز تأیید کننده اثرات ضد میکروبی این گیاه بر علیه باکتری اشرشیا کلی با قطر هاله بازدارندگی ۱/۸±۱۶/۷ میلی متر بوده است. علاوه بر آن

در حال حاضر یرسینوزیس بعد از استرپتوکوکوزیس، دومین بیماری مهم باکتریایی در سطح مزارع ماهیان سردآبی کشور بوده و در سال ۱۳۹۰، ۱۵ مورد همه گیری این بیماری در سطح مزارع ماهیان سردآبی کشور به طور رسمی گزارش و به تأیید رسیده است (Zorriehzahra et al., 2012)، بنابراین لزوم توجه و اتخاذ سیاست های مؤثر و عملی برای کنترل این بیماری پیش از پیش احساس می شود. مقاومت دارویی میکروارگانیسم ها که ناشی از مصرف بی رویه داروها، خود درمانی و تجویز آنتی بیوتیک توسط افراد غیر متخصص است. یکی از معضلات مهم صنعت آبی پروری می باشد. مقاومت دارویی منجر به افزایش مرگ و میر، ناتوانی و افزایش هزینه های مراقبت بهداشتی می شود که پیشگیری از بروز مقاومت و انتشار میکروارگانیسم مقاوم می تواند منجر به کاهش اثرات زیان آور و هزینه های وابسته به آنها شود (Wang et al., 2007). عدم موفقیت در درمان بسیاری از بیماری های مزمن و حاد، اثرات جانبی مضر داروهای شیمیایی و آنتی-بیوتیک ها و مقاومت روز افزون باکتری های مختلف از قبیل یرسینیا راگری در برابر بسیاری از داروها به ویژه آنتی بیوتیک های رایج، گرایش محققین را نسبت به مطالعه در زمینه استفاده از اسانس ها و عصاره های گیاهی

انگل‌ها و باکتری‌ها از جمله یرسینیا راگری به آن نسبت داده می‌شود (Harris *et al.*, 2001). بررسی Hussein و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که گیاه سیر دارای اثرات ضد باکتریایی قوی بر علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و گونه‌های آیروموناس در ماهی نیل تیلایا می‌باشد، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد. در این مطالعه میزان MIC برای استرپتوکوکوس اینیایی ۶۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای گونه‌های آیروموناس ۵۰۰-۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. این در حالی است که در مطالعه حاضر میزان MIC این عصاره برای یرسینیا راگری ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. در مطالعات دیگر، میزان MIC عصاره آبی گیاه سیر برای آئروموناس هیدروفیلا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (Pachanawan *et al.*, 2008) و برای استرپتوکوکوس آگالاکتیه در هیبرید ماهی تیلایا ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (Alsaid *et al.*, 2010).

پس از عصاره سیر، عصاره اسفرزه دارای خاصیت ضد باکتری نسبتاً مناسبی نسبت به عصاره چای سبز روی یرسینیا راگری بود. Motamedi و همکاران (۲۰۱۰)، اثر ضد میکروبی عصاره‌های الکلی و متانولی اسفرزه را بر روی برخی باکتری‌های بیماری‌زا بررسی کردند و دریافتند که حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی عصاره‌ی اتانولی اسفرزه در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و بوردتلا برونشی اسپیکتیکا ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای عصاره متانولی آن، به ترتیب ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین خواص ضد میکروبی این گیاه به حضور ترکیبات اسید گالیک، تانیک و گلیکوزیدی به نام اوکوبین نسبت داده شده است (Leung & Steven, 1996). در مطالعه حاضر مقادیر MIC عصاره چای سبز برای یرسینیا راگری ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد، این در حالی است که مقدار MIC این گیاه برای باکتری پسودوموناس آئروژینازا ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای اشرشیاکلای ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد (Hashemi *et al.*, 2012). تفاوت مشاهده شده در مقادیر MIC عصاره چای سبز برای گونه‌های مختلف ممکن است مرتبط با ترکیبات متفاوت تشکیل‌دهنده

مطالعه صورت گرفته توسط Kaur و Arora (۲۰۰۷) نیز مؤید اثرات ضد میکروبی قابل توجه عصاره آبی رازیانه بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلای و سالمونلا تیفی بود، در این بررسی بیشترین میزان مهار کنندگی رشد این گیاه بر روی استافیلوکوک اورئوس دیده شد. بررسی‌های صورت گرفته نشان دهنده آن است که اثر ضد میکروبی عصاره رازیانه بیشتر در ارتباط با حضور ترکیب‌های آنتول، لیمونن و فنچون است (Zargary, 1991).

نتایج آزمایشگاهی این مطالعه نشان داد که عصاره گزنه پس از رازیانه، دارای خاصیت ضد باکتری مناسبی روی باکتری بیماری‌زای یرسینیا راگری بوده است. به طوریکه حداقل غلظت کشندگی آن ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، حداقل غلظت مهار کنندگی آن ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و منطقه مهار رشد در محدوده ۲۳-۲۱ میلی‌متر بوده است. در مطالعات صورت گرفته قبلی، اثرات ضد میکروبی عصاره آبی گزنه بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی از قبیل باسیلوس سرئوس، ویبریو پاراهمولیتیکوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، انتروباکتر آئروژنس، کلیسیلا و سالمونلا مشخص شده است (Gulchin *et al.*, 2004). مطالعات نشان دهنده اثرات ضد میکروبی عصاره گزنه بر روی باکتری‌های بیماری‌زا سودوموناس آئروژینواز، اشرشیاکلای و کاندیدا آلبیکنز در شرایط آزمایشگاهی بود (Gulchin *et al.*, 2004). در مجموع، خاصیت ضد میکروبی گزنه بیشتر به دلیل حضور ترکیبات فنلی آن (اسید کافئیک، اسید فرولیک، اسید سیناپیک، فیسیتین و میریستین) نسبت داده می‌شود، که موجب افزایش نفوذ پذیری و از هم گسستگی دیواره سلولی باکتری و در نهایت تخلیه محتویات و مواد داخل سلولی آن می‌گردد (Zargary, 1991).

در مطالعه حاضر، قطر هاله بازدارندگی رشد عصاره سیر برای یرسینیا راگری $22/6 \pm 1/1$ میلی‌متر تعیین شد، که از قدرت باکتری‌کشی کمتری نسبت به عصاره‌های رازیانه و گزنه برخوردار بود ولی تفاوت معناداری را با داروی فورازولیدون نشان داد ($p < 0/05$). مهمترین جزء مؤثر سیر ترکیب آلی سولفورداری به نام آلیسین (Allicin) می‌باشد که خواص ضد میکروبی این گیاه بر روی قارچ‌ها،

منابع

- Abd-Elallatif, A. and Ebraheem, K., 1996.** Studies on the effects of *Hibiscus subdariffa*, *Allium sativum* and *Negella sativa* on some bacterial isolates of chickens. Egyptian University Journal, 17, 245-251.
- Alishahi, M., Ghorbanpour, M., Najafzadeh, H. and Pashm Forosh, M., 2010.** Evaluation of antibacterial effect some of the herbal extracts on *Streptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila*. Iranian Journal of Veterinary, 6, 21-30.
- Alsaid, M., Daud, H., Bejo, S.K. and Abuseliana, A., 2010.** Antimicrobial activities of some culinary spice extract against *Streptococcus agalaciae* and its prophylactic uses to prevent streptococcal infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis species*). World Journal of Fish and Marine Sciences, 2, 532-538.
- Arora, D.S. and Kaur, G.J., 2007.** Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. Journal of Natural Medicine, 61, 313-317.
- Gulchin, İ., Küfrevioğlu, İ., Oktay, M. and Büyükokuroğlu, M.E., 2004.** Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L). Journal Ethnopharmacology, 90, 205-15.
- Harris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S. and Lioyd, D., 2001.** Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). Applied

عصاره‌های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش، گونه گیاه، سن گیاه در هنگام تهیه عصاره، شرایط محیطی و فصلی، زمان برداشت، روش خشک کردن و استخراج عصاره، نوع اندام مورد عصاره گیری، تفاوت ژنتیکی و در نهایت متفاوت بودن سویه‌های میکروبی مورد مطالعه باشد. بررسی‌ها نشان دهنده آن است که پلی فنل‌های (تانن-های) عصاره چای سبز از طریق اتواکسیداسیون و تولید پر اکسید هیدروژن، اثرات مهاری خود را بر رشد میکروارگانیسم‌ها اعمال می‌کند (Smith et al., 2003). در بین عصاره‌های مورد مطالعه عصاره گلپر دارای کمترین اثر مهار کنندگی رشد روی یرسینیا را کری بود. مقدار MIC گلپر برای این باکتری ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. در مطالعه صورت گرفته توسط Nazemi و همکاران (۲۰۰۶) میزان MIC عصاره الکلی این گیاه برای استافیلوکوکوس اورئوس و انترکوک مدفوعی به ترتیب ۲۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد، که در مقایسه با مطالعه حاضر از قدرت بیشتری برخوردار بود، این در حالی است که نتایج این محقق نشان داد که این عصاره آبی فاقد اثرات ضد میکروبی بر علیه سویه‌های باکتریایی و قارچی مورد مطالعه بوده است.

در پایان می‌توان اظهار نمود که عصاره‌های گیاهان رازیانه، گزنه و سیر دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی روی باکتری یرسینیا را کری در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند. در ادامه لازم است که مطالعات وسیع‌تر و دامنه‌دارتری در شرایط بالینی، در مزارع پرورشی آبزیان صورت گیرد و پس از مشخص شدن غلظت مؤثر، مکانیسم اثر و غیر سمی بودن آنها، عصاره‌های گیاهی مذکور به عنوان مواد ضد میکروبی طبیعی و جدید به صنعت آبی پروری کشور معرفی و جایگزین آنتی بیوتیک‌های مقاوم و داروهای شیمیایی، به منظور درمان یرسینیوزیس شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود می‌دانند تا از جناب آقای دکتر شفیق شفیعی، بخاطر تهیه سوش باکتریایی استاندارد، تقدیر و تشکر نمایند.

- Microbiology and Biotechnology, 57, 282-286.
- Hashemi, A., Shams, S., Kalantar, D., Taherpour, A. and Barati, M., 2012.** Antibacterial effect of methanolic extract of *Camellia Sinensis L.* on *Pseudomonas aeruginosa* strains producing β -lactamases. Journal of Gorgan University of Medical Sciences, 14, 136-142.
- Hussein, M.M.A., Hamdy Hassan, W. and Ibrahim Moussa, M., 2013.** Potential use of allicin (garlic, *Allium sativum* Linn, essential oil) against fish pathogenic bacteria and its safety for monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Food Agriculture and Environment, 11, 696-699.
- Jean, S.S. and Hsueh, P.R., 2011.** High burden of antimicrobial resistance in Asia. International Journal of Antimicrobial Agents, 37, 291-295.
- Leung, A.X. and Steven, F., 1996.** Encyclopedia of common natural ingredients- used in food, drugs and cosmetic. Publication John Wiley and Sons Inc, USA. 95-102.
- Libster, M., 2002.** Herb guide for nurses. Florida: Delmar Thomson Learning. 198-202.
- Mandenova, I., 1987.** Heracleum. Flora: Iranica Umbelliferae. 168-187.
- Miguel, M.G., Cruz, C., Faleiro, L., Simoes, M.T. and Figueiredo, A.C., 2010.** Foeniculum vulgare essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. Natural Production Community, 5, 319-328.
- Motamedi, H., Darabpour, E., Gholipour, M. and Seyyednejd, S.M., 2010.** Antibacterial effect of ethanolic and methanolic extracts of *plantago ova* and *oliveria decumbens* endemic in iran against some pathogenic bacteria. International Journal Pharmacology, 6, 117-122.
- Nazemi, A., Hashemi, M., Khatami Nejad, M.R. and Porshamsian, K., 2006.** First evaluation of antimicrobial activity of ethanolic and water extracts of *Heracleum persicum*. Islamic Azad University Journal, 15, 91-94.
- Pachanawan, A., Phumkhachorn, P. and Rattanachaikunsopon, P., 2008.** Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Biotechnology, 5, 419-424.
- Rakhshandehroo, F., Modarresi Chahardehi, A. and Zamani Zadeh, H.R., 2009.** Study on the antiviral effect of aquatic and alcoholic extracts of *Urtica dioica L.* on rose mosaic viral diseases in vitro culture. Iranian Journal Medical Aromatic Plants, 25, 403-413.
- Roomiani, L., Soltani, M., Akhondzadeh Basti, A., Mahmoodi, A., Taheri Mirghaed, A. and Yadolahi, F., 2013.** Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of zoonotic disease in farmed fish.

- Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12, 702-716.
- Sagdic, O., Yasar, S. and Kisioglu, A.N., 2005.** Antibacterial effects of single or combined plant extracts. *Annal Microbiology*, 55, 67-71.
- Shahrani, M., Shir Zadeh, H., Yousefi, H., Moradi, M.T. and Moghaddasi, J., 2006.** Effect of *Heracleum persicum* extract on acid and pepsin secretion level in both basic and stimulated conditions with Pentagastrin in rat. *Shahrekord University Medical Sciences Journal*, 4, 41-35.
- Shoa Hassani, A.R., Ordouzadeh, N., Ghaemi, A., Nazari, R. and Hamdi, K., 2008.** Comparing black and green tea (*Camellia Sinesis L*) extracts effects on the growth inhibition and biofilm formation of enterobacteriaceae. *Journal of Arak University Medical Sciences*, 11, 64-73.
- Silva, N.C.C. and Fernandes Junior, A., 2010.** Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Animal Toxins and Tropical Disease*, 16, 402-413.
- Sivam, G.P., 2001.** Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. *American Society of Nutrition Sciences*, 131, 1106-1108.
- Smith, A.H., Imlay, J.A. and Mackie, R.I., 2003.** Increasing the oxidative stress response allows *Escherichiacoli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. *Applied Environment Microbiology*, 69, 3406-3110.
- Soltani, M., Ghodrathnama, M., Taheri Mirghaed, A., Zargar, A. and Rooholahi, Sh., 2013.** The effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from Rainbow trout farms. *Journal of Veterinary Microbiology*, 9, 1-11.
- Soylu, S., Soyly, E.M. and Evrendilek, G.A., 2009.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of bitter fennel (*Foeniculum vulgare*) and dill (*Anethum graveolens*) against the growth of food-borne and seed-born pathogenic bacteria. *Italian Journal of Food Sciences*, 21, 347-355.
- Tabanca, N., Ma, G., Pasco, D.S., Bedir, E. and Kirimer, N., 2007.** Effect of Essential Oils and Isolated Compounds from *Pimpinella* Species on NF-B: A Target for Anti-inflammatory Therapy. *Phytotherapeutic Research*, 21, 741-745.
- Wang, C.Y.C., Shie, H.S., Chen, S.C., Hung, J.P. and Hsie, H.T.C., 2007.** *Lactococcus garvieae* infections in human: possible association with aquaculture outbreaks. *International Journal of Clinical Practice*, 61, 68-73.
- Whitemore, A. and Naidu, A.S., 2000.** Thiosulfinates. In: Naidu, A. S. *Natural Food Antimicrobial System*. New York: Harpercollins College. 108-114.
- Zargary, A., 1991.** *Medicinal plants*. Tehran: Tehran University Publications. 128-136.

Zorriehzahra, M.J., Hassan, H.M.D., Nazari, A., Gholizadeh, M. and Farahi, A., 2012. Assessment of environmental factors effects on enteric redmouth

disease occurrence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Hamedan province, Iran. Journal of Comparative Clinical Pathology Research, 3, 79-85.

**Study the antibacterial effect some of the herbal extracts on
Yersinia ruckeri in vitro**

Adel M.^{1*}; Safari R.²; Zorriehzahra M.J.¹; Elahi R.³

*miladadel85@yahoo.com

1-Aquatic animal Health & Diseases Dept., Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization(AREEO), P.O.Box:13185-116 Tehran, Iran

2-Biotechnology Dept., Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute(IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization(AREEO), P.O.Box:961 Sari, Iran

3-DVM Graduted, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, P.O.Box:115 Shahrekord, Iran

Abstract

Due to increased bacterial resistance to common antibiotics, tendency towards using herbal extracts is increasing. In this study, antibacterial effects of the extracts of *Heracleum persicum*, *Foeniculum vulgare*, *Plantago psyllium*, *Camellia Sinensis*, *Urtica dioica* and *Allium sativum* on *Yersinia ruckeri* were investigated in vitro condition. The disc diffusion method, minimum bacteriocidal concentration (MBC) and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts against *Y. ruckeri* were employed to determination of antibacterial effects of extracts and furasolidon were used as standard. The MIC of extract of *Heracleum persicum*, *F. vulgare*, *P. psyllium*, *C. Sinensis*, *U. dioica* and *A. sativum* were 400, 75, 250, 250, 75 and 150 ($\mu\text{g/ml}$), respectively, MBC of these extracts was 610, 100, 500, 250, 150 and 250 ($\mu\text{g/ml}$) respectively, and diameter of zone of inhibition were 17.6 ± 0.6 (mm), 23.6 ± 1.2 , 20.4 ± 0.9 , 18.8 ± 0.7 , 21.2 ± 1.3 and 22.6 ± 1.1 (mm) were, respectively, against *Y. ruckeri*. Results of present study demonstrated that the extracts of *F. vulgare*, *U. dioica* and *A. sativum* were appropriate antibacterial agents against *Y. ruckeri*. Based on the result of this study, using these herbal extracts were suitable alternative than common antibiotics to treatment systematic infections caused by *Y. ruckeri*.

Keywords: Antibacterial effects, Herbal extracts, *Yersinia ruckeri*.

*Corresponding author